



Title	IN VIVO TRANSFECTION OF GENES FOR RENIN AND ANGIOTENSINogen INTO THE GLOMERULAR CELLS INDUCED PHENOTYPIC CHANGE OF THE MESANGIAL CELLS AND GLOMERULAR SCLEROSIS
Author(s)	新井, 誠
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39019
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	新井誠
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第11771号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	IN VIVO TRANSFECTION OF GENES FOR RENIN AND ANGIOTENSINogen INTO THE GLOMERULAR CELLS INDUCED PHENOTYPIC CHANGE OF THE MESANGIAL CELLS AND GLOMERULAR SCLEROSIS (腎臓糸球体細胞へのレニン、アンジオテンシノーゲン遺伝子導入によるメサンギウム細胞の形質転換ならびに糸球体硬化)
論文審査委員	(主査) 教授 安東 明夫
	(副査) 教授 松沢 佑次 教授 鎌田 武信

論文内容の要旨

【目的】

糸球体硬化症は、メサンギウム基質増加とそれによる毛細血管腔の閉塞を特徴とする慢性糸球体疾患共通の末期病変である。本症の成立には、糸球体の主要な構成細胞のひとつであるメサンギウム細胞の形質転換が深く関与していることが知られており、これを惹起する因子を明らかにすることが、慢性糸球体疾患の進展機序を解明する上で非常に重要であると考えられる。近年「糸球体局所のレニン-アンジオテンシン系の亢進が、糸球体硬化病変の進行を促進する。」という仮説が提唱されているが、この仮説を支持する過去の報告をまとめると、大きく以下の2点に集約できる。すなわち、

- 1) アンジオテンシンIIは培養メサンギウム細胞の細胞増殖や細胞外基質産生を促す(in vitro)。
- 2) アンジオテンシン変換酵素阻害剤の投与により、実験腎炎、ヒト腎炎における糸球体硬化病変の進行が抑制される(in vivo)。

というものであり、いずれもレニン-アンジオテンシン系がin vivoで糸球体硬化症の増悪因子として作用することを間接的に示唆している。

今回われわれは、上述の仮説をより直接的に検証するため、ヒト・レニン、ヒト・アンジオテンシノーゲンの遺伝子を同時にラット腎臓糸球体に導入し、糸球体局所のレニン-アンジオテンシン系を亢進させることにより、メサンギウム細胞の形質転換ならびに糸球体硬化病変が惹起されるかどうかを検討した。

【方法】

I. ラット腎臓へのin vivo遺伝子導入

1) 遺伝子導入法の選択

DNAと核蛋白質high mobility group-1(HMG-1)をリポソームに包み込み、センダイウイルス(hemagglutinating virus of Japan; HVJ)とリポソームを反応させてHVJのエンベロープをもつリポソームをつくり、これを細胞に接触させて遺伝子を導入する方法(HVJ-リポソーム法)を採用した。HVJはリポソームの細胞膜への融合効率を高め、HMG-1は細胞内に導入された遺伝子DNAを速やかに核内に移行させる作用を有する。

2) 発現ベクターの作製

Chicken β -actin promoterの下流にヒト・アンジオテンシノーゲンのcDNAを組み込んだ発現ベクター(pBact-

angiotensinogen) およびクロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ (CAT) の cDNA を組み込んだ発現ベクター (pBact-CAT) を作製した。ヒト・レニンの発現ベクター (pUC-CAGGS-renin) は Dr.Tomita (Circ Res. 1993;73:898-905) より提供された。

3) HVJ-リポソームの作製

ガラス管の内壁に混合脂質を薄膜状に付着させ、pUC-CAGGS-renin, pBact-angiotensinogen (各100 μg) を HMG-1 (64 μg) と共に加え、ボルテックス、超音波処理により DNA-HMG-1 混合物を脂質リポソーム内に封入する。次いで、紫外線で不活化した HVJ を添加して incubate 後、蔗糖勾配遠心法により HVJ-リポソームの層を採取した。同様に pBact-CAT を含む HVJ-リポソームも作製した。

4) ラット腎臓への HVJ-リポソームの導入

8週齢雄性 Sprague-Dawley ラットの左腎動脈にカテーテルを挿入し、HVJ-リポソーム懸濁液0.5ml (pUC-CAGGS-renin, pBact-angiotensinogen 各 5 μg 含有) を注入した (n=10)。対照ラットには同様の手法で pBact-CAT 10 μg を含む HVJ-リポソーム懸濁液0.5mlを注入した (n=10)。

II. 遺伝子導入前後のラット血圧の測定

遺伝子導入前日、導入後3日目、7日目の血圧を tail cuff 法にて測定した。

III. 血漿レニン濃度の測定および糸球体組織の検討

遺伝子導入後3日目 (n=3), 7日目 (n=7) に採血、腎摘を行い以下の検討を行った。

1) 血漿ヒト・レニン濃度の測定

2) ラット腎臓におけるヒト・レニン発現の確認

3) 光顕標本による腎臓病理所見の検討

4) メサンギウム細胞の形質転換の検討

糸球体における間質型 (I型, III型) コラーゲン, α -smooth muscle actin の発現の有無を免疫組織染色により確認した。これらは正常糸球体細胞では発現していない蛋白であり、メサンギウム細胞形質転換の代表的マーカーとして認識されている。

【成績】

- 1) 遺伝子導入3日後、7日後ともにレニン、アンジオテンシノーゲン遺伝子導入群 (以下RAG群) とCAT遺伝子導入群 (以下CAT群) との間に血圧の有意差は認められなかった。また、両群とも遺伝子導入3日後、7日後の血漿中にヒト・レニンは検出されなかった。
- 2) 遺伝子導入3日後のRAG群の腎臓で、約30%の糸球体にヒト・レニンの発現が認められた。CAT群の腎臓ではヒト・レニンの発現は認められなかった。
- 3) 遺伝子導入7日後のRAG群の一部の糸球体で細胞外基質増加が認められた。CAT群では糸球体変化は認められなかった。両群とも尿細管、間質の変化は特に認めなかった。
- 4) 遺伝子導入7日後のRAG群の糸球体内に I型, III型コラーゲンおよび α -smooth muscle actin の発現を認めた。これらはCAT群では認められなかった。

【総括】

レニン、アンジオテンシノーゲン遺伝子を *in vivo* でラット腎臓に導入し、糸球体で過剰発現させることにより、メサンギウム細胞の形質転換ならびに糸球体細胞外基質の増加が誘導されることを明らかにした。本実験において全身血圧の上昇、血漿ヒト・レニンの上昇がともに認められなかったことから、糸球体局所のレニン-アンジオテンシン系の亢進が、糸球体硬化病変の進展に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

慢性糸球体疾患の終末病理像である糸球体硬化症の成立機序を解明することは、慢性糸球体疾患の治療法を発展させる上で非常に重要な課題である。糸球体硬化病変の進展にかかる重要なファクターのひとつとして、メサンギウ

ム細胞の形質転換が近年注目を集めているが、本研究は、糸球体局所のレニン-アンジオテンシン系を亢進させることにより、メサンギウム細胞の形質転換ならびに糸球体細胞外基質の増生が起こることを明らかにした。

本研究以前にも、レニン-アンジオテンシン系の亢進が糸球体硬化病変を増悪させるという仮説を支持するデータはいくつか報告されているが、培養メサンギウム細胞を用いた *in vitro* の実験、あるいはアンジオテンシン変換酵素阻害剤を用いて間接的に結論を導いた実験がほとんどであり、*in vivo* で上記仮説を直接的に証明したのは、本研究が初めてである。

レニン-アンジオテンシン系と糸球体硬化病変との関わりを考える場合に全身血圧の影響が常に問題になるが、本実験は本学細胞工学センターで開発された遺伝子導入テクニックを有効に利用して、全身血圧に影響を与えることなく腎臓糸球体局所のレニン-アンジオテンシン系を賦活化する系を確立しており、その点でも意義深い。

以上をもって、本研究は学位授与に値すると考えられた。